

Oponentský posudek doktorské dizertační práce Mgr. Barbary Elsnicové „Ultrastrukturální charakteristiky a ontogenetické vztahy hemocytů klíšat“ vypracované na Biologické fakultě

Jihočeské Univerzity v Českých Budějovicích v roce 2005.

Předložená práce je ve formě dnes již méně běžného spisu bez zahrnutí publikovaných článků. Sestává z 51 stran vlastního textu a 15 příloh – tabulek, matic pro fylogenetickou analýzu, kladogramů a fotografické dokumentace, o celkovém rozsahu 26 stran. Práce je členěna klasickým způsobem na úvod, metodiky, výsledky, diskusi a závěrečné shrnutí nejdůležitějších výsledků.

V úvodu podává autorka solidní přehled literárních údajů o hemocytech členovců – jejich morfologii, ultrastruktuře, klasifikaci a věnuje se blíže problémům a nesrovnalostem v jejich popisech a názvosloví. Zvláštní část je věnována hemocytům klíšat, kde je situace v klasifikaci podobně nepřehledná jako u ostatních skupin členovců. Zahrnutý jsou i poznatky o ontogenezi hemocytů – hematopoiezi, proliferaci a diferenciaci. Závěrem zmiňuje poznatky o nových přístupech k typizaci hemocytů pomocí molekulárních markerů, jelikož stávající morfologické a ultrastrukturální popisy se ukazují jako nedostatečné a limitující. Celkově působí úvodní přehled uceleným dojmem a ukazuje, že autorka má o problematice přehled a porozuměla jí. V této části chci upozornit pouze na gramatickou nejednotnost psaní některých výrazů (organizmus x mechanismus, plasmatocyty x cytoplazma, mezoderma x mesothorax, mitóza atp.) a na pravidlo, že poprvé zmiňovaný druh má být vypsán celým rodovým jménem (str. 6). Rovněž by mě zajímalo, zda jsou ve „společnosti klíšatářů“ běžně používány výrazy „tvrdá“ a „měkká“ klíšata pro čeledi Ixodidae, resp. Argasidae, nebo zda jde pouze o autorčin doslovný překlad v angličtině běžně užívaných hard and soft ticks – v česky psané literatuře jsem se s touto terminologií dosud neseťkal.

Následná kapitola shrnuje jasné vytčené cíle práce, mezi které patří zejména morfologická, ultrastrukturální a cytochemická charakterizace hemocytů *Ixodes ricinus* a *Ornithodoros moubata* a na základě vytipování vhodných znaků sestavení matic pro následné kladistické analýzy.

Kapitola Materiál a metodiky je rovněž poměrně přehledně zpracovaná, některé metody by si možná zasloužily podrobnější popis pro jejich pozdější reprodukování (např. ředění lektinů – nikde z textu nevyplývá skutečná koncentrace v mg/ml). Dále je pro ligandovou afinitní techniku za použití značených lektinů používán ne zcela správně výraz „imunoafinitní značení“ vhodný spíše pro značení protilátkami. Je uváděna poze metoda nepřímé fluorescence, ačkoliv značení FITC-lektiny patří mezi přímé fluorescenční techniky. Dále není uvedeno jakou fluorescenční značkou byl označen používaný streptavidin, místo toho je uvedeno zavádějící „biotinylované lektiny s navázaným streptavidinem se jeví jako červené“. V tabulce 1 by bylo vhodné uvést vazebné specifity lektinů – ty jsou uvedeny až v kapitole výsledky. Navíc tyto specifity v kap. 4B2.2 nejsou úplné nebo jsou nepřesné, např. ConA a LCA nejsou specifické pro jen manózu, ale i glukózu a některé další lektiny mají vyšší specifitu k sacharidům vázaným v řetězcích než pro takto uvedené monosacharidy. Na str. 16 je uveden „lead citrát“ ačkoliv existuje český ekvivalent a olovo je dostatečně známý prvek. V tabulce 1 je biotin nesprávně uveden v kolonce „fluorescenční značka“. Všechny zdroje lektinů jsou zde uvedeny latinským názvem, pouze concanavalin A triviálním názvem (pochází z *Canavalia ensiformis*).

Kapitola Výsledky by zasloužila poněkud přehlednější uspořádání, ačkoliv k množství popisných dat to jistě není jednoduchá záležitost. Celá kapitola nepůsobí příliš čtivě, nevýhodou je i umístění obrázků a kladogramů vzadu v příloze – toto je zřejmě důsledek formy dizertace, v regulérním článku by tento problém byl zřejmě odstraněn. Jinak obrazová dokumentace je velmi dobré kvality, originální výsledky pozorování jsou podrobně popsány a

zdokumentovány. Na str. 28 se zdá, že tabulka 3 je neúplná, jak vyplývá z dalšího textu, lektiny LCA a WGA se vážou (ne „váží“, jak autorka někde chybně používá) nejen ke granulocytům. Na str. 29 odst. 2 autorka uvádí, že jmenované markery vykazovaly shodnou afinitu na úrovni fluorescenční mikroskopie, což nemusí být v důsledku tak jisté, když se dále ukazuje, že existuje více subtypů granulocytů a plasmacytů – mohou zde existovat překryvy epitopů v různých typech buněk.

V diskusi prokazuje autorka velmi dobrou schopnost analyzovat výsledky, porovnat je s údaji v literatuře a vyvodit z nich obecnější závěry. V tomto směru je tato kapitola „dobrým počtením“, napsaná čtivě a konzistentně. Autorka zde opět prokázala dobré porozumění problematice a schopnost samostatného kritického myšlení.

Závěrem lze říci, že autorka získala originální výsledky, které jsou *de facto* jednou z nemnoha studií s tímto metodickým přístupem, a ukázaly na správný směr další cesty ve výzkumu klíčících hemocytů – molekulární charakterizaci a antigenní typizaci, neboť jak se ukázalo i v této práci, pouhá morfologická a ultrastrukturální charakterizace může vést k mylným představám o diferenciaci a průběhu ontogeneze hemocytů. Za vynikající přístup a výsledek považuji zejména tu část práce, kde autorka matematicky hodnotí možné vývojové směry jednotlivých linií hemocytů a snaží se tak standardizovat a zobjektivnit získané výsledky. Je možné, že počet typů a klasifikace hemocytů navržené autorkou se časem změní na základě zahrnutí dalších molekulárních markerů. V tomto smyslu je její práce pilotní studií. Vzhledem k tomu, že studium imunitních buněk bezobratlých je zatím „v peřinkách“ oproti tomu, co je známo o imunitních mechanismech obratlovců, hlavně savců, se jedná o důležitý příspěvek k jejich poznání. Doporučuji jejich brzkou publikaci formou článku.

Dotazy závěrem:

- V obecném textu se hovoří o vzniku dalších generací hemocytů u klíšťat dělením již diferencovaných typů buněk – byl tento jev pozorován a potvrzen i ve vašem případě ?


- Je jasné, že pro získání matic a uvedené zpracování dat není důležité k jaké konkrétní molekule hemocyty se daný marker váže a že důležité je hlavně standardní zpracování materiálu, což zde bylo dodrženo. Přesto ale bych se rád zeptal, proč nebyly pro pokusy s (imuno)fluorescencí použity živé hemocyty a zda někdy byly porovnávány rozdíly v reaktivitě živých a fixovaných hemocytů. Jsou živé hemocyty opravdu tolik náchylné k zacházení a hrozila by rychlá degradace některých typů a tím zkreslení výsledků ?

- Jak se autorka dívá na možnost využití izolace jednotlivých typů klíčících hemocytů pomocí metody „FACS“ („fluorescence assisted cell sorting“), popř. jejich izolaci pro další, třeba ultrastrukturální, molekulární či biochemickou, typizaci, pomocí např. lektiny nebo protilátkami „coatovaných“ magnetických částic?

Přes mé připomínky k práci, které jsou převážně formálního charakteru a jistě by byly odstraněny v průběhu oponentury odeslaného manuscriptu, hodnotím předloženou dizertaci kladně a doporučuji po obhajobě její přijetí jako podkladu pro uznání vědeckého titulu Ph.D.

V Praze dne 21. 3. 2006

RNDr. Libor Mikeš, Ph.D.

  
Katedra parazitologie PřF UK Praha



Doc. RNDr. František Weyda, CSc.  
Biologické centrum AV ČR, Entomologický ústav  
Branišovská 31  
370 05 České Budějovice  
Telefon: přímá linka 387 775 261, ústředna 387 771 111  
Fax: 385 310 354  
E-mail: weyda@entu.cas.cz

## **Oponetský posudek na doktorskou disertační práci Mgr.Barbary Elsnicové: Ultrastrukturální charakteristiky a ontogenetické vztahy hemocytů klíšťat.**

Již v úvodu tohoto oponentního posudku musím konstatovat, že autorka předložila vědecky vyspělou práci. Moderní a v oboru výzkumu hemocytů vesměs originální přístupy nebývaly v minulosti vždy obvyklé.

Předložená disertační práce má obvyklé členění. Název práce dobře vystihuje řešenou problematiku.

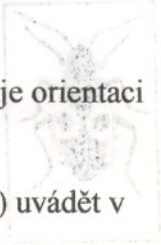
V úvodu autorka shrnuje současný stav znalostí o problematice hemocytů členovců. Tento úvod je velmi dobře sestavený a autorka v něm prokazuje, že dobře ví, o čem je v tomto oboru u jejich předchůdců řeč. Studium hemocytů resp. zpracování výsledků vykazovalo v minulosti znaky jisté stagnace. Práce byly založeny především na morfologických přístupech a ty - jak se ukázalo - nedávají zrovna v tomto oboru dostatečné odpovědi na celou řadu otázek. Velká část literatury v tomto oboru klasifikovala hemocyty na ty a ty typy, přičemž se výsledky jednotlivých autorů často lišily. Ani zahrnutí "ontogeneze hemocytů" nedalo dostačující odpovědi. Celý obor poněkud tápal při snaze vysvětlit zákonitosti výskytu hemocytů, jejich klasifikace a vztahy u jednotlivých skupin. To si autorka práce dobře uvědomila jak při zpracování těchto úvodních statí, tak při vlastním výzkumu. Přesně to definuje na str.9 v posledním odstavci. Ke strukturální klasifikaci bylo nutné přidat funkční vlastnosti a ontogenetické vztahy. A přínosem je originální přístup autorky v zavedení zpětné rekonstrukce vývoje jednotlivých buněčných linií pomocí metod obdobných rekonstrukci fylogeneze organismů. Celá tato problematika je dobře a čtivě zpracována v úvodních partiích (ty zasahují až do strany 13). Oceňuji zvláště hledání správné interpretace rozporných výsledků morfologických a "funkčních" (str.12 dole) a to, že si autorka uvědomuje význam metodických přístupů.

Cíle práce a postupy řešení formuluje autorka naprosto přesně. Také "Materiál a metodiky" představuje soubor silných výzkumných nástrojů, z nichž některé nebyly v oboru studia hemocytů běžně využívány. Kritický a fundovaný přístup k interpretaci výsledků morfologického studia buněk autorka osvědčila při rozhodování o přítomnosti/nepřítomnosti určitého ultrastrukturního znaku (str.20).

Chtěl bych zvláště vyzdvihnout obrazovou dokumentaci práce. Obrázky jsou na profesionální úrovni a lze je ihned bez větších úprav publikovat.

V předložené práci se ukazuje, že dostatečně poznaná problematika oboru, dobře definované cíle, metodické schopnosti a novátorské přístupy přinášejí u připravených výzkumníků také dobré výsledky. A ty zde evidentně jsou. Spojení morfologických (ultrastrukturních) dat s daty dynamickými a následná kladistická analýza obohatily úroveň znalostí v oboru. Diskuze pak zhodnotila dosžané výsledky a zasadila je do rámce současných znalostí. V závěrech práce pak autorka dobře shrnula to, čeho dosáhla.

K předkládané práci nemám žádné zásadní námítky. Následně uvádím komentáře, které mne napadly v průběhu čtení práce, náměty do diskuze a některé připomínky:



poznámka (1) k formální úpravě práce: práce je velmi dobře členěna, což usnadňuje orientaci v textu; naproti tomu obsah práce v úvodu je zde uspořádán nepřehledně

poznámka (2) k formální úpravě práce: u knih v "citované literatuře" (str.44 a dál) uvádět v citacích knih celkový počet stran, jak je to ve vědeckých pracích běžné

poznámka (1) k metodikám: centrifugace materiálu složeného z volných buněk může vykazovat známky třeba i mírné destrukce už při nižších rychlostech- a zde bylo použito 3-4 tisíce rpm- byl zde detekován nějaký vliv na hemocytu?

poznámka (2) k metodikám: ultrastrukturní metody byly v této práci velmi dobře aplikovány; dobré bylo využití akce par osmia při postfixaci, snížení obsahu CO<sub>2</sub> při kontrastování nebo využití proteinu A při aplikaci imunometod.

poznámka k formulaci: věta "LR White umožňuje zalévání vzorků bez předchozí fixáže parami osmia..." není přesná; LR White a fixace parami osmia nejsou v příčinné souvislosti

partikule koloidního zlata u obr.8 nejsou vzhledem k použitému zvětšení a typu obrázku vždy dostatečně viditelné- možná by pomohl ještě jeden výřez z optimálního místa při větším zvětšení (jen u tohoto obrázku, na dalších už je při větším zvětšení vše v pořádku)

chtěl bych se zeptat autorky v čem spatřuje rozdíl mezi granulem (označeno gr) a denzím granulem (označeno dg) na obrázku 9?

Závěrem bych chtěl konstatovat, že předložená dizertační práce představuje rozsáhlou a metodicky i časově náročnou studii. Autorka v ní dokazuje, že má přehled o historii oboru (zde zhodnoceno v literárních údajích) a dovede své komplexní výsledky s těmito údaji srovnávat a především kriticky hodnotit. Já pak hodnotím především fundovaný přístup autorky. Po formální stránce je práce velmi kvalitně a pečlivě napsána. V neposlední řadě jsou výsledky velmi dobře obrazově dokumentovány. Doporučuji proto předloženou práci k obhajobě jako jeden z předpokladů udělení doktorského titulu.

V Českých Budějovicích dne 20. března 2006.

Doc. RNDr. František Weyda, CSc.



# MIKROBIOLOGICKÝ ÚSTAV AV ČR

Sektor imunologie a gnotobiologie

Vedoucí: RNDr. Martin Bilej, DrSc.

Videňská 1083

142 20 Praha 4

## Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Barbary Elsnicové „Ultrastrukturální charakteristiky a ontogenetické vztahy hemocytů klíš'at“

Disertace Mgr. Barbary Elsnicové byla vypracována pod vedením Prof. RNDr. Václava Hypši, CSc. a Prof. RNDr. Libora Grubhoffera, CSc. na Biologické fakultě Jihočeské university. Oba školitelé patří k předním odborníkům na otázky fylogeneze parazitismu a molekulárních vztahů mezi parazity a jejich vektory. Právě tyto zkušenosti byly využity a aplikovány na studium ontogenetických a diferenciačních vztahů hemocytů dvou reprezentativních druhů klíš'at. Podobně jako u jiných bezobratlých je nomenklatura buněčných typů nepřehledná, dílem vycházející historicky z morfologických kritérií a dílem přizpůsobená moderním cytochemickým, imunocytochemickým a molekulárně biologickým metodám. Disertace tak vnáší kombinací morfologického, ultrastrukturálního a imunocytochemického pohledu nové světlo do oblasti diferenciací a názvosloví hemocytů klíš'at.

Po formální stránce je disertace rozdělena obvyklým způsobem. Začíná zdařilým literárním přehledem, který je věnován charakterizaci hemocytů a jejich diferenciaci a úloze. Po jasné definici cílů disertace jsou dostatečně detailně a účelně popsány použité metodické přístupy. Výsledková část je doplněna tabulkovou, grafickou a velmi kvalitní obrazovou přílohou. Získané výsledky jsou věcně, přiměřeně zdrženlivě a kriticky diskutovány a závěrem jsou výstižně shrnuty.

Barbaře Elsnicové se podařilo definovat dvě homologické linie hemocytů – nefagocytující linii granulocytů typu II a linii fagocytárních hemocytů zahrnující plasmacyty a granulocyty typu I. Toto dělení je důležité, protože odráží funkční vlastnosti buněk více než pouze morfologická kritéria. Dále bylo sestaveno diferenciační schéma jednotlivých subpopulací hemocytů. Zajímavý je popis subpopulace sferulocytů přítomných pouze u klíš'áka *Ornithodoros moubata* a nikoliv u druhého modelu *Ixodes ricinus*.

Disertace je napsána přehledně, výjimečně čtivým stylem. Přes velmi pečlivé zpracování však zařadil šotek a místy se objevují úsměvné chybičky (např. prohlášení, že tato magisterská diplomová práce byla vypracována....., ze šesti základních kategorií hemocytů je vyjmenováno sedm

– str. 2). Překvapivě jsem v disertaci neobjevil ani zmínku, že většina výsledků byla publikována v impaktovaném časopise *Experimental and Applied Acarology*. Nevím, zda je k tomu nějaký důvod nebo je to jen skromností, osobně to považuji za velký klad doktorské práce (a u některých oborových rad i za podmínku obhajoby). K práci nemám žádné koncepční ani faktické připomínky, nicméně bych rád položil dvě spíše diskusní otázky.

- Obecně jsou nádorová onemocnění bezobratlých prakticky neznámá, ale přesto se v poslední době vzácně objevují práce o hematopoetických chorobách zejména u členovců (např. Gateff E.: Hematopietic disorders in invertebrates. In: Söderhäll K., Iwanaga S., Vasta G.R. (Eds.) *New Directions in Invertebrate Immunology*, SOS Publications, Fair Haven, 1996, pp.1-21). Při studiu bylo zpracováno úctyhodné množství cytologických preparátů. Zaznamenali jste nějaké známky hematopoetických chorob nebo maligního zvratu?
- Ocenil jsem, že pro charakterizaci hemocytů byly použity lektiny nebo vlastní protilátky proti jednotlivým subpopulacím. Často jsou totiž používány bez většího opodstatnění protilátky proti markerům savčích buněk. Na druhou stranu však takovéto pokusy při použití protilátek proti evolučně starým povrchovým molekulám mohou být užitečné. Zkoušeli jste i jiné protilátky?

Mgr. Barbara Elsnicová, splnila všechny vytčené cíle i nároky kladené na disertační práci a prokázala schopnost samostatné vědecké práce. Z tohoto důvodu hodnotím její disertaci pozitivně a doporučuji k obhajobě vědecké hodnosti PhD.

Praha, 8. 3. 2006

  
RNDr. Martin Bilej, DrSc.